



УДК 577.113.4

© 1992 Д.Г. Кнорре, В.В. Власов

КЛЕТочНЫЕ МЕМБРАНЫ КАК БАРЬЕР ПРИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЯХ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ИХ ПРОИЗВОДНЫХ И АНАЛОГОВ

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск

При использовании олигонуклеотидов и их реакционноспособных производных для направленного воздействия на комплементарные участки генетических структур в составе клеток и живых организмов возникает проблема прохождения этих гидрофильных соединений через липофильные плазматические мембраны. Рассматриваются основные пути преодоления возникающего барьера: 1) эндоцитоз, основанный на взаимодействии олиго- и полинуклеотидов с фосфолипидами в присутствии двухзарядных катионов; 2) использование неионных аналогов олигонуклеотидов; 3) присоединение объемистых гидрофобных радикалов; 4) использование мембранных переносчиков; 5) взаимодействие олигонуклеотидов и их производных со специфическими рецепторами.

В 1967 г. в отделе биохимии Новосибирского института органической химии СО АН СССР (позднее по инициативе Ю.А. Овчинникова преобразован в Институт биоорганической химии СО АН СССР) был предложен новый подход, обещавший существенное повышение селективности воздействия химических реагентов на нуклеиновые кислоты. Интерес к этой проблеме был вызван заметными успехами методов повреждения нуклеиновых кислот как способа подавления роста злокачественных опухолей и размножения вирусов. Среди нашедших успешное применение соединений можно упомянуть ароматические аналоги азотистых ипритов, например хлорамбуцил n - $(\text{ClCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, *цис*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, некоторые антибиотики, способные к окислительной деструкции ДНК, например блеомицин. Однако общим недостатком этих реагентов является их одновременное поражающее действие на нуклеиновые кислоты пациента. В связи с этим Н.И. Гринева и сотрудниками было предложено для введения реакционноспособных групп в выбранный участок ДНК использовать олигонуклеотиды заданной структуры, несущие эти группы. При этом предполагалось, что олигонуклеотид, образуя комплементарные комплексы с соответствующими участками нуклеиновой кислоты-мишени, будет направлять (адресовать) реакционноспособную группу именно на эту мишень. Подход был первоначально назван комплементарно адресованной модификацией нуклеиновых кислот [1, 2].

Впоследствии было предложено несколько вариантов применения олигонуклеотидов и их производных для воздействия на комплементарные

мишени. Поскольку последние являются носителями определенной биологически осмысленной информации, соответствующие реагенты получили название антисмысловых. Было показано, что подавлять развитие вирусов в клетках хозяина могут и немодифицированные антисмысловые олигонуклеотиды. Было предложено для воздействия на биологические функции нуклеиновых кислот использовать производные олигонуклеотидов, несущие полиароматические остатки, которые стабилизируют образование комплементарных комплексов с мишенью. Последний прием оказался весьма эффективным для повышения модифицирующей способности реакционноспособных групп, связанных с олигонуклеотидным адресом. Создан широкий спектр реакционноспособных производных, несущих алкилирующие группы, остатки, катализирующие окислительную деструкцию нуклеиновой кислоты-мишени, фотоактивные радикалы, атомы платины, способные координировать гетероциклы мишени. Подробное описание полученных реагентов и их взаимодействия с мишенями может быть найдено в обзорах и монографиях [3–5]. Олигонуклеотиды и их реакционноспособные производные испытаны в культуре клеток на ряде вирусов. Имеются первые результаты по защите такими производными инфицированных животных. Эти данные собраны в специальных монографиях [6,7] и обзорах [8].

Однако для того, чтобы достигнуть биологической мишени в клетке и тем более в живом организме, антисмысловые реагенты должны прежде всего пересечь плазматические мембраны соответствующих клеток. Между тем олигонуклеотиды и большинство их производных являются отрицательно заряженными гидрофильными веществами, а плазматическая мембрана в значительной мере образована липофильным фосфолипидным бислоем. Настоящая статья посвящена рассмотрению основных проблем, связанных с проницаемостью клеточных мембран для олигонуклеотидов, их производных и аналогов.

1. Взаимодействие ДНК с фосфолипидными мембранами

Для понимания механизмов проникновения олигонуклеотидов и их производных через клеточные мембраны важное значение имеет знание общих принципов взаимодействия олиго- и полинуклеотидов с фосфолипидными бислоями. Систематические исследования этого вопроса были на протяжении последних лет выполнены в НИБХ В.Г. Будкером с сотрудниками. В ходе этих исследований было показано, что в присутствии ионов Mg^{2+} [^{14}C]ДНК соосаждается с липосомами, образованными как смесью митохондриальных липидов, так и лецитином. Полученный комплекс не разрушается при промывании буферным раствором, но легко диссоциирует при обработке EDTA [9]. Было обнаружено, что вторичная структура ДНК значительно изменяется после взаимодействия с липосомами. ДНК становится чувствительной к расщеплению нуклеазой S1; отношение метилирования диметилсульфатом N1 аденина к N7 гуанина возрастает от величины 0,025, характерной для нативной ДНК, до 0,21 в присутствии липосом, что ближе к значению для денатурированной ДНК (0,46) [10]. В то же время отмеченное изменение ДНК не является денатурацией. Точка плавления ДНК фага T7 и комплекса $rho(A) \cdot rho(U)$ даже выше в присутствии фосфолипидных мембран [11]. Поляризационные флуоресцентные исследования взаимодействия ДНК из молок лосося с синтетическим β, γ -дипальмитоилфосфатидилхолином (DPPC) или яичным фосфатидилхолином в присутствии дифенилгексатриена в качестве флуоресцентной метки показали наличие изменений в состоянии фосфолипид-

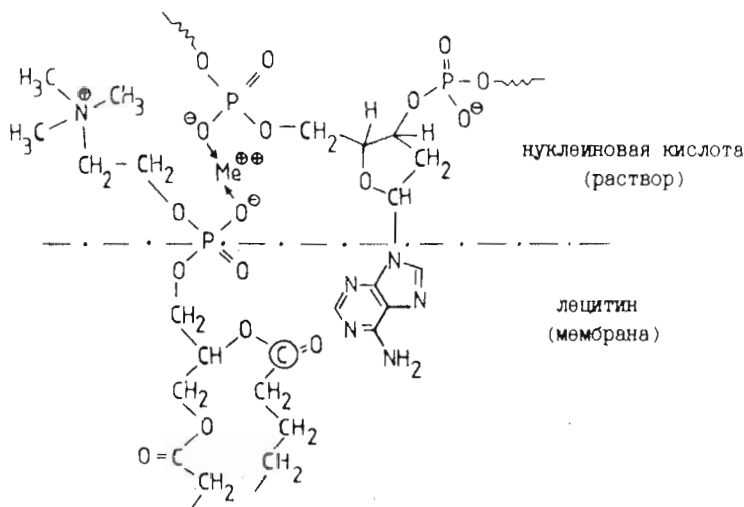


Рис. 1. Схема взаимодействия ДНК с фосфолипидной мембраной в присутствии двухвалентных катионов

ного бислоя, что проявляется в увеличении температуры фазового перехода [12]. Подобные эффекты наблюдались также для липосом в присутствии poly(U), poly(A), poly(dA), что указывает на их взаимодействие с одноцепочечными полинуклеотидами [11].

Ряд данных ясно свидетельствует, что в этом взаимодействии участвуют гетероциклы нуклеиновых кислот. ИК-спектры poly(A) с характеристическими колебаниями аденинового кольца в области 1630 см^{-1} изменяются в присутствии липосом. Характер изменений говорит о расположении кольца в гидрофобной фазе [13]. Увеличение температуры фазового перехода липидного бислоя ΔT_f более значительно в случае poly(A) и poly(dA) по сравнению с poly(U). Обработка poly(dA) кислотой, вызывающая 70%-ную потерю адениновых остатков, приводит к исчезновению эффекта [11]. Сигнал ^{13}C -ЯМР атома C2 глицеринового фрагмента фосфолипида смещается в сильное поле при взаимодействии с poly(A), что согласуется с эффектом действия кольцевого тока цикла аденина на этот атом [14]. В целом результаты позволяют предположить, что взаимодействие может происходить через солевые мостики, образованные двухвалентными катионами между фосфатами нуклеиновой кислоты и фосфолипида с частичным проникновением гетероциклов в гидрофобную фазу (рис. 1).

Эти данные, по-видимому, существенны для понимания механизма поглощения нуклеиновых кислот липосомами. Было показано, что присутствие двухвалентных катионов стимулирует инкапсулирование ДНК в липосомы. Соответствующие эксперименты были выполнены с обработанной ультразвуком ДНК фага T7 и липосомами из DPPC или из смеси DPPC с холестерином (7:3). Обработка смеси ДНК и липосом ионами Ca^{2+} приводила к проникновению части ДНК внутрь липосом. Инкапсулирован-



Рис. 2. Схема поэтапной транслокации ДНК через фосфолипидную мембрану.
БМЛ — большие моноламеллярные липосомы

ная ДНК становилась нечувствительной к расщеплению ДНКазой и соосаждалась с липосомами после повторной обработки EDTA, которая удаляла ДНК, связанную с внешней стороной липидного бислоя. Добавление бромистого этидия после удаления несвязанной ДНК не приводило к увеличению флуоресценции, типичной для взаимодействия ДНК — этидий. В то же время было показано, что инкапсулированная ДНК не имела доступа к внутреннему содержанию липосомы. Это было обнаружено с использованием липосом, "заряженных" бромистым этидием. Упомянутый выше переход части ДНК в нечувствительное к ДНКазе состояние не приводит к увеличению флуоресценции этидия. Возгорание флуоресценции наблюдалось лишь после дополнительного озвучивания полученной системы.

На основании приведенных экспериментальных данных схема захвата ДНК включает в себя "впячивание" участка фосфолипидной мембраны, связанной ДНК, с последующим "отшнуровыванием" этого участка и образованием внутренней везикулы, содержимое которой изолировано от содержимого исходной липосомы (рис. 2) [15]. Этот механизм подтверждается данными электронной микроскопии. ДНК, абсорбированная в виде петли на мембране, глубокое "впячивание" мембраны в местах присоединения ДНК и, наконец, ДНК, окруженная мембраной внутри липосомы, — все это хорошо видно на микрофотографиях [16]. Такой механизм захвата продемонстрирован для случая присоединения к поверхности клетки большой молекулы ДНК или достаточно длинных цепей (не короче 13–20 звеньев). Для отдельных молекул олигонуклеотидов и их гидрофильных производных он едва ли имеет место. Однако он может быть реализован, если возможно тандемное присоединение нескольких олигонуклеотидов к клетке одновременно.

Следует отметить, что сам факт проникновения олигонуклеотидов и их гидрофильных производных в клетку не вызывает сомнений. Об этом в первую очередь свидетельствуют результаты, полученные в работах [17, 18] по подавлению внутриклеточного развития вирусов саркомы Рауса и ВИЧ-1. О прохождении алкилирующих производных олигонуклеотидов, несущих $\text{CICH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_4$ -остаток (RCl-остаток) через плазматическую мембрану клетки, свидетельствует регистрация алкилирования внутриклеточных биополимеров, в том числе ДНК, при обработке этими реагентами клеток асцитной карциномы Кребс 2 [19] и мышинных фибробластов L929 [20]. Связывание меченых олигонуклеотидов с клетками

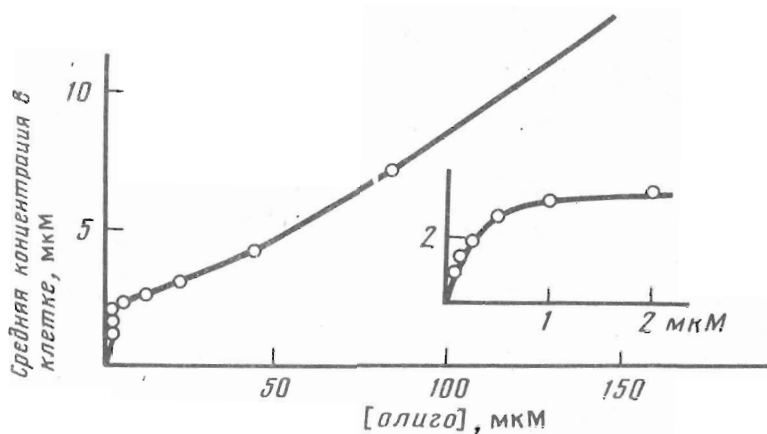


Рис. 3. Зависимость предельной средней (через 4 ч) концентрации $\text{CIRCH}_2\text{NHpdT}(\text{pdT})_{15}$ в мышечных фибробластах от концентрации реагента в среде. Врезка: начальный участок той же зависимости

L929 продолжается в течение 2–3 ч, после чего достигает насыщения. Платовые значения количества связанного олигонуклеотида как функция концентрации последнего в среде сначала быстро нарастают, затем идет существенно более медленное, приблизительно линейное нарастание соответствующих значений (рис. 3) [21]. Захват подавляется типичными ингибиторами эндоцитоза, такими, как азид натрия, дезоксиглюкоза, цитохалазин. Однако прямое сопоставление этих данных с описанным выше механизмом эндоцитоза ДНК в липосомы в настоящее время неправомерно, так как требует учитывать наличие в плазматической мембране большого числа белков, которые наряду с фосфолипидами могут принимать участие в таком переносе. Некоторые данные в пользу участия белков будут приведены в следующих разделах.

2. Неионные аналоги олигонуклеотидов

Главной причиной гидрофильности олигонуклеотидов и их производных является наличие отрицательного заряда на каждом межнуклеотидном фосфате. В связи с этим в работах П.Миллера с сотрудниками было предложено использовать в качестве антисмысловых производных олигонуклеотидов их Р-этиловые эфиры [22], а в последующем — их метилфосфонатные аналоги. Обзор этих работ можно найти в [23]. Было показано, что блокирование отрицательного заряда на фосфатной группе не изменяет значительно способность олигонуклеотидов участвовать в комплементарных взаимодействиях, и это вполне естественно, поскольку подобные взаимодействия основаны на образовании водородных связей между гетероциклами, а фосфатные группы остаются вне участия. Сравнительное исследование скорости прохождения олигонуклеотидов и их неионных аналогов, инкапсулированных в липосомы, показало, что последние диффундируют через мембраны в несколько раз быстрее [24].

Степень алкилирования РНК реакционноспособными производными
фосфоэтилированных олиготимидилатов
(10^{-6} моль реагента/моль нуклеотидного остатка)

Реагент (исходная концентрация 0,5 мкМ)	Расчетная концентрация реагента в клетке, мкМ	Poly(A)- РНК	Poly(A)- последо- ватель- ности
$\text{Tp}_R(\text{Et})\text{Tp}_R(\text{Et})\text{Tp}_R(\text{Et})\text{TpU}>\text{CHRCI}$	1,0	0,7	3
$\text{Tp}_S(\text{Et})\text{Tp}_S(\text{Et})\text{Tp}_S(\text{Et})\text{TpU}>\text{CHRCI}$	3,3	20,0	184
$\text{Tp}(\text{Et})\text{Tp}(\text{Et})\text{Tp}(\text{Et})\text{TpU}>\text{CHRCI}$	1,6	9,0	77
$\text{TpTpTpTpU}>\text{CHRCI}$	0,3	1,5	16

Представлялось перспективным испытать алкилирующие CIR-производные неионных аналогов олигонуклеотидов для воздействия на внутриклеточные биополимеры. Первые эксперименты такого рода были выполнены с фосфоэтилированными олигонуклеотидами, а именно с производными $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH})_2\text{p}[\text{dTp}(\text{Et})]_4\text{U}>\text{CHRCI}$ и $[\text{dTp}(\text{Et})]_9\text{U}>\text{CHRCI}$, которыми обрабатывались клетки асцитной карциномы Кребс 2. В экспериментах с первым производным было обнаружено, что при 5°C степень модификации poly(A)-фрагментов мРНК, комплементарных адресующей части реагента, значительно (~ 30 раз) превышает эту величину для других нуклеиновых кислот [25]. Еще большая разница (на два порядка) наблюдалась в этой же системе с декануклеотидным аналогом при 20°C [26].

Определенные затруднения при работе с неионными аналогами возникают в связи с тем, что каждый этилированный или замененный на метилфосфонатный межнуклеотидный фосфорный остаток становится хиральным, т.е. соединение получается в виде смеси большого числа диастереомеров. Сродство этих изомеров к комплементарным последовательностям существенно зависит от конфигурации фосфорного остатка. На примере олиготимидилатов было установлено, что более прочные дуплексы образуются в случае *S*-конфигурации при атоме фосфора. Поэтому в дальнейшем были проведены эксперименты с использованием реакционноспособных производных фосфоэтилированных олиготимидилатов с определенной конфигурацией у хиральных атомов фосфора [27]. Из таблицы видно, что степень алкилирования poly(A)-последовательностей в клетках этими соединениями значительно превосходит таковую для других биополимеров, причем *S*-изомер значительно превосходил *R*-изомер по алкилирующей способности. Стоит также отметить, что внутриклеточная концентрация реагентов с этилированными фосфотриэфирными группами, особенно в случае *S*-изомеров, значительно превосходит концентрацию в среде, в то время как концентрация неэтерифицированных производных в клетке ниже, чем в среде.

3. Олигонуклеотиды, несущие липофильные остатки

Альтернативным подходом к повышению гидрофобности олигонуклеотидов и их реакционноспособных производных является присоединение к одной из концевых групп или одному из межнуклеотидных

фосфатов объемного гидрофобного радикала. При этом полностью сохраняется полинуклеотидный остов и не возникает проблем, связанных с хиральностью атомов фосфора и разделением сложных смесей диастереомеров или с необходимостью вести стереоселективный синтез олигомеров.

В последние годы описано получение олигонуклеотидов, несущих остатки стероидов [28, 29], алкильные радикалы [31, 32] и остатки липидов [33]. Показано, что холестериновые производные олигонуклеотидов [30] присоединяются к клетке в 30 раз более эффективно, чем немодифицированные. Олигонуклеотиды, несущие одновременно остаток холестерина и алкилирующий RCl-фрагмент, проникают в клетки и реагируют с клеточной ДНК. У производных олигонуклеотидов, несущих октильный, додецильный, октадецильный остатки, также наблюдалось увеличение транспорта в клетки соответственно в 3, 4 и 10 раз по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами [31]. Липофильные производные показали повышенную антивирусную активность по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами в экспериментах с ВИЧ-1 [29, 31] и с вирусом гриппа [32].

В то же время детальное исследование взаимодействия холестериновых производных олигонуклеотидов с липидными мембранами показало, что эффекты, зарегистрированные в экспериментах с клетками, не могут быть объяснены повышением проницаемости для них липидного бислоя. Было обнаружено, что холестериновое производное олиготимидилата действительно связывается с липосомами, но олигонуклеотидный фрагмент остается снаружи. Poly(A), несущий флуоресцентную метку, связывался с комплексом олиготимидилата с липосомой, но метка оставалась снаружи, поскольку наблюдалось гашение флуоресценции гидрофильными тушителями, такими, как Г. Аналогично спиновая метка на poly(A) оставалась доступной восстановлению гидрофильным восстановителем — аскорбатом [28].

4. Мембранные переносчики

Еще один возможный подход к транспорту олигонуклеотидов и их производных в клетки, причем не зависящий от взаимодействия нуклеиновая кислота—клетка, — это использование мембранных переносчиков-липосом и вирусных оболочек. Описано применение липосом для доставки фосфотиоатного аналога "антисмыслового" олигонуклеотида, направленного на мРНК онкогена *c-myc*, в клетки HL60 [34].

Другой эффективный способ транспорта олигонуклеотидов в цитоплазму клеток — использование реконструированных оболочек таких вирусов, которые проникают в клетки посредством слияния мембран вирионов с клеточными мембранами. Этот подход был проверен с использованием в качестве носителя олигонуклеотидов реконструированных оболочек вируса Сендай (POBC). Была разработана эффективная методика заключения производных олигонуклеотидов в такие оболочки с выходом 25–30% [35]. Методика основана на повторении процедуры замораживания — оттаивания пустых POBC в присутствии раствора олигонуклеотида. Эта процедура быстрая, проводится при низких температурах и может использоваться для введения неустойчивых реакционноспособных производных олигонуклеотидов. Заполненные оболочки стабильны в течение 2–3 ч инкубации с клетками и присоединяются к клетке с эффективностью, близкой к этой величине у вирусов (около 60%). Заполненные радиоактивным CIR-олиготимидилатом POBC эффективно доставляют его в

цитоплазму клеток асцитной карциномы Кребс 2, где это производное реагирует с комплементарными poly(A)-последовательностями клеточных РНК. Заключение в РОВС производного $\text{ClRCH}_2\text{NHpdT}(\text{pdCpdT})_6$, направленного на ген РНК-репликазы вируса клещевого энцефалита, позволило добиться понижения титра вируса в инфицированных клетках почек эмбрионов свиньи на 5 порядков при концентрации реагента в среде 0,1 мкМ. Для получения такого же эффекта при применении свободного производного потребовалась концентрация его в среде 100 мкМ [36].

Для переноса производных олигонуклеотидов был также адаптирован метод введения в другой тип естественных переносчиков — мембраны (тени) эритроцитов человека. Мембраны получают при лизисе эритроцитов в результате гиперосмоса, заполняют их нужным соединением при инкубации в солевом растворе в условиях, благоприятных для восстановления мембран эритроцитов. Процедура достаточно мягкая для заполнения переносчика реакционноспособными производными олигонуклеотидов. В присутствии агента слияния, в качестве которого используют инактивированные УФ-облучением вирусы Сендай, заполненные реагентом тени эффективно присоединяются к клетке и доставляют производные олигонуклеотидов в цитоплазму. Это было зарегистрировано по повышению эффективности алкилирования poly(A)-фрагментов мРНК клеток асцитной карциномы Кребс 2 RCl-производным олиготимидилата при заключении его в тени эритроцитов [35].

5. Взаимодействие олигонуклеотидов с белками клеточной поверхности

Для выяснения механизма проникновения олигонуклеотидов и их реакционноспособных производных в клетки было проведено исследование взаимодействия реакционноспособного производного $\text{ClRCH}_2\text{NHpdT}(\text{pdT})_{15}$ с мышинными фибробластами. Было обнаружено, что при короткой инкубации клеток с реагентом, в течение которой мало вероятно существенное проникновение реагента внутрь клетки, происходит ковалентное присоединение олигонуклеотида к белку массой около 80 кДа [21]. Реакция специфична для олиго- и полинуклеотидов — в присутствии немеченого олигонуклеотида, а также тРНК, однонитевой и двунитевой ДНК уровень мечения снижается. В то же время ни 10-кратный избыток хондроитинсульфата, ни 25-кратный избыток гепарина не подавляют процесс. Уровень модификации с ростом концентрации реагента в среде достигает плато, соответствующего присутствию на поверхности каждой клетки порядка 10^5 молекул указанных белков. Оцененная из этой зависимости константа диссоциации комплекса белков с реагентом составляет 0,2 мкМ. Полученные данные можно рассматривать как указание на существование на этих клетках специальных рецепторов полинуклеотидов. Аналогичные белки обнаружены на ряде других клеточных линий млекопитающих. Их биологическая роль остается неясной.

Поскольку показана возможность взаимодействия реакционноспособных производных олигонуклеотидов с белками плазматической мембраны, были предприняты специальные исследования их воздействия на белок CD4 — мембранный белок Т-лимфоцитов, с которым связывается вирус ВИЧ-1 в качестве первой стадии его проникновения в клетки. Оказалось, что реагент $\text{ClRCH}_2\text{NHpdT}(\text{pdCpdT})_6$ в концентрации 5 мкМ реагирует с белком, т.е. CD4 имеет существенное сродство к олигонуклеотиду. Реакция оказалась специфичной для олигонуклеотидов — модификация существенно снижалась в присутствии 1 мкМ $(\text{pdC})_{28}$. Кроме того, реакция полностью подавлялась в присутствии фосфотиоатного

аналога этого олигонуклеотида [37], что коррелирует с очень высокой анти-ВИЧ-активностью этого аналога.

Обнаружение на поверхности клеток белков, взаимодействующих с олигонуклеотидами, а также высокое сродство к олигонуклеотидам мембранного белка CD4 дают основание предполагать, что олигонуклеотиды и их производные могут проникать в клетки с помощью этих белков через промежуточное комплексообразование с последующей интернализацией. Не исключено, что аналогичный механизм обеспечивает и проникновение внутрь клеток холестериновых производных олигонуклеотидов, которые, как описано в разделе 3, в отсутствие белков залипают в фосфолипидном бислое мембраны. Известно, что на поверхности ряда клеток млекопитающих существуют рецепторы стероидных гормонов, и взаимодействие с ними является первой стадией проникновения холестериновых производных в клетки. Однако вопрос о роли специфических рецепторов, обеспечивающих захват и последующую интернализацию анти-смысловых олигонуклеотидов и их производных, требует специального исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I.*//Tetrahedron Lett. 1967. P. 3557—3562.
2. *Гринева Н.И., Карнова Г.Г.*// Молекулярн. биология. 1974. Т. 8. С. 832—844.
3. *Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F.*// Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression/ Ed. J.S. Cohen. L.: MacMillan Press, 1989. P. 173—196.
4. *Knorre D.G., Zarytova V.F.*// Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS/ Ed. E. Wickstrom. N.Y.: Wiley-Liss, 1991. P. 195—218.
5. *Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V.*// Soviet Scientific Reviews/ Ed. M.B. Volpin. Amsterdam: Harwood Academic Publishers GmbH, 1989. P. 271—339.
6. Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS/ Ed. E. Wickstrom. N.Y.: Wiley-Liss, 1991.
7. Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression/Ed. J.S. Cohen. L.: MacMillan Press, 1989.
8. *Knorre D.G., Vlassov V.V.*//Biomed. Sci. 1990. V. 1. P. 334—343.
9. *Budker V.G., Kazatchkov Y.A., Naumova L.P.*// FEBS Lett. 1978. V. 95. № 1. P. 143—146.
10. *Budker V.G., Godovikov A.A., Naumova L.P., Slepneva I.A.*// Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 11. P. 2499—2515.
11. *Биченков Е.Е., Будкер В.Г., Коробейничева И.К., Савченко Е.В., Филимонов В.В.*// Биол. мембраны. 1988. Т.5. № 8. С.843—851.
12. *Gruzdev A.D., Khrantsov V.V., Weiner L.M., Budker V.G.*// FEBS Lett. 1982. V. 137. № 2. P. 227—230.
13. *Мальцева Т.В., Биченков Е.Е., Коробейничева И.К., Будкер В.Г.*// Биофизика. 1983. Т. 28. № 5. С. 766—770.
14. *Будкер В.Г., Биченков Е.Е., Вольдман Я.В., Вайнер Л.М.*// Биол. мембраны.1986. Т. 3. № 8. С. 843—851.
15. *Будкер В.Г., Горохова О.Е., Соколов А.В.*// Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 2. С. 479—482.
16. *Будкер В.Г., Киселева Е.В., Соколов А.В.*// Биол. мембраны. 1987. Т. 4. № 11. С. 1201—1208.

17. Zamecnik P.C., Stephenson M.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 75. P. 280—284.
18. Zamecnik P.C., Goodchild J., Taguchi Y., Sarin P.S.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 4143—4146
19. Vlassov V.V., Godovikov A.A., Kobets N.D., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Bukrinskaya A.G.// Advances in Enzyme Regulation 24/ Ed. G. Weber. L.: Pergamon, 1986. P. 301—320.
20. Власов В.В., Горохова О.Е., Иванова Е.М., Кутявин И.В., Юрченко Л.В., Якубов Л.А., Абдукаюмов М.Н., Скоблов Ю.С.// Биополимеры и клетка. 1986. V. 2. С. 323—327.
21. Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6454—6458.
22. Miller P.S., Barrett J.C., Ts'o P.O.P. // Biochemistry. 1974. V. 13. P. 4887—4890.
23. Miller P.S.// Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression/ Ed. J.S. Cohen. L.: MacMillan Press, 1989. P. 79—95.
24. Akhtar S., Basu S., Wickstom E., Juliano R.L.// Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 5551—5559.
25. Karpova G.G., Knorre D.G., Ryte A.S., Stephanovich L.E.// FEBS Lett. 1980. V. 122. P. 21—24.
26. Knorre D.G., Zarytova V.F., Karpova G.G., Stephanovich L.E.// Nucl. Acids Res., Symp. Ser. 1981. № 9. P. 195—198.
27. Abramova T.V., Vlassov V.V., Lebedev A.V., Ryte A.S.// FEBS Lett. 1988. V. 23. P. 243—245.
28. Биченков Е.Е., Будкер В.Г., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Лохов С.Г., Савченко Е.В., Теплова Н.М.// Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 735—742.
29. Letsinger R.L., Zhang G., Sun D.K., Ikeichi T., Sarin P.S.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6553—6556.
30. Boutorin A.S., Gus'kova L.V., Ivanova E.M., Kobetz N.D., Zarytova V.F., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V.// FEBS Lett. 1989. V. 254. P. 129—132.
31. Abramova T.V., Blinov V.M., Vlassov V.V., Gorn V.V., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Konevats D.A., Plyasunova O.A., Pokrovsky A.G., Sandahchiev L.S., Svinarchuk F.P., Starostin V.P., Chaplygina S.R.// Nucleotides and Nucleosides. 1991. V. 10. P. 419—422.
32. Кабанов А.В., Vinogradov S.V., Ovcharenko A.V., Krivonos A.V., Melik-Mubarov N.S., Kiselev V.I., Severin E.S.// FEBS Lett. 1990. V. 259. P. 327—330.
33. Shea R.G., Marsters J.C., Bishofberger N.// Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3777—3783.
34. Neckers L.M.// Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression/ Ed. J.S. Cohen. L.: MacMillan Press, 1989. P. 211—231.
35. Власов В.В., Иванова Е.М., Кренделев Ю.Д., Кутявин И.В., Овандер М.Н., Райт А.С., Свинарчук Ф.П., Якубов Л.А.// Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5. С. 52—58.
36. Погодина В.В., Фролова Т.В., Абрамова Т.В., Власов В.В., Иванова Е.М., Кутявин И.В., Плетнев А.Г., Якубов Л.А.// Докл. АН СССР. 1988. Т. 301. С. 1257—1260.
37. Yakubov L., Yurchenko L., Nechaeva M., Rykova E., Karamyshev V., Tonkinson J., Vlassov V., Stein C.A.// Nucl. Acids Res., Symp. Ser. 1991. V. 24. P. 311.

CELL MEMBRANES AS A BARRIER IN THE BIOLOGICAL APPLICATIONS
OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES, THEIR DERIVATIVES AND ANALOGS

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division of Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk*

Use of oligonucleotides and their derivatives as genetargeted drugs encounter a problem of crossing of lipophilic cell membranes by these hydrophilic compounds. This paper considers the approaches to overcome the arising barrier: 1) penetration by endocytosis in the presence of bivalent cations; 2) use of non-ionic oligonucleotide analogs; 3) attachment of bulky hydrophobic radicals; 4) use of membrane carriers; 5) interaction of oligonucleotides and their derivatives with specific receptors.